

Rahim Ağzı Kanser Alt-Tiplerine Özgü Moleküler Hedef, Biyoişaretçi Adaylar ve Yeniden Konumlandırılan İlaçların Belirlenmesi

Identification of Cervical Cancer Sub-type Specific Molecular Targets, Biomarkers and Repurposed Drug Candidates

Beste TURANLI¹ 

¹Marmara Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 34722, Kadıköy/İstanbul, TÜRKİYE

Öz

Hassas tıp uygulamaları, geleneksel tedaviden farklı olarak kanser hastaları arasındaki bireysel farklılıkları dikkate alarak hastaları sınıflandırır. Yapılan alt tiplene ile kanser teşhisi ve tedavi yanıtının tahmini için yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, sistem biyolojisi yaklaşımları kullanılarak, rahim ağzı kanserinin en yaygın onkojenik iki türü olan HPV-16 enfekte ve HPV-18 enfekte grupları ayrı ayrı incelenmiştir. Her iki alt-tip için kanserin gelişimi ile ilgili ayrıncı biyobelirteçler sunulmuş, hassas tıp uygulaması olabilecek alt-tip özgü teşhis ve tedavi yöntemleri bağlamında moleküler hedefler sunulmuş amaçlanmıştır. Literatürde var olan çalışmalar, hastalık heterojenliği ve alt-tip bilgilerinden bağımsız olarak doğrudan rahim ağzı kanserine odaklanmıştır. İlk defa bu çalışmada HPV-16 ve HPV-18 enfekte hasta grupları ile ilgili transkriptomik veri ayrı ayrı çalışılmıştır. Rahim ağzı kanserinde alt-tip özgü diyagnostik, prognostik ve ilaç hedefi olabilecek biyobelirteçlerini belirlemek için mikrodizi meta-analizi yapılmıştır. İlk olarak incelenen protein-protein etkileşimindeki hub proteinlerde iki alt-tipte de ortak olan 8 protein (AR, AURKA, BRCA1, CDKN2A, EZH2, MYC, PCNA, STAT) dışında, 17'şer protein alt-tiplere özgü hub proteinler olarak bulunmuştur. Transkripsiyonel düzenlemede önem arz eden TF ve miRNA'lar arasında işaretçi molekül algoritması ile ön plana çıkanlar bulunmuştur. TF'lerde alt-tipleri ayırt edebilecek belirgin farklılık gözlenmemekle birlikte, sadece HIF1α HPV-18 enfekte grubunda işaretçi TF bulunmuştur. HPV-16 özgü sadece hsa-miR-101-3p ve hsa-let-7d-5p bulunmuştur. HPV-18 enfekte gruba özgü ise 81 miRNA vardır. Çalışmanın en sonunda ise hub proteinlerin bazılarını hedef alan ilaçlar üzerinden ilaç yeniden konumlandırma yapılmıştır. HPV-16 enfekte kanser tedavisi için ibuprofen ve procainamide ilaçları; HPV-18 enfekte kanserler için ise hidralazine ve memantin önerilen ilaçlardır.

Anahtar kelimeler: Sistem biyotıbbi, rahim-ağzı kanseri, biyobelirteçler, hastalık alt-tipleri, ilaç yeniden konumlandırma.

Abstract

Precision medicine aims to classify patients by considering individual differences among cancer patients, unlike traditional treatments. Novel biomarkers should be determined for cancer diagnosis and prediction of treatment response via sub-typing. In this study, HPV-16 and HPV-18 infected groups which are the two most common oncogenic types of cervical cancer, were examined separately using system biology approaches. By presenting differential biomarkers related to the development of cancer for both subtypes, it is aimed to present molecular targets for subtype-specific diagnosis and treatment options from the precision medicine perspective. Previous studies have focused on cervical cancer regardless from disease heterogeneity and subtype information. For the first time in this study, transcriptomic data on HPV-16 and HPV-18 infected patient groups were studied separately. Meta-analysis of microarray datasets was performed to identify subtype-specific biomarkers and drug targets in cervical cancer. Protein-protein interactions were constructed, and 17 proteins were found as hub proteins specific to subtypes, except common 8 proteins (AR, AURKA, BRCA1, CDKN2A, EZH2, MYC, PCNA, STAT). Among the TF and miRNAs, which are important in transcriptional regulation were found as reporter biomolecules. Although no significant difference was observed in TF that could distinguish subtypes, HIF1α was the only reporter TF for HPV-18 infected group. hsa-miR-101-3p and hsa-let-7d-5p were found specific to HPV-16 group while there were 81 miRNAs specific to HPV-18. Lastly, drug repositioning was performed focusing drugs that target some of the hub proteins. Ibuprofen and procainamide drugs were repurposed for the treatment of HPV-16 infected cancer whereas hydralazine and memantine were repurposed drugs for HPV-18 infected cancers.

Keywords: Systems Biomedicine, cervical cancer, biomarkers, disease sub-types, drug repositioning.

I. GİRİŞ

Rahim ağzı kanseri, serviksin dış yüzeyini kaplayan yassı (skuamöz) hücreler ya da endoservikal kanalda mukus üreten adenomatoz hücrelerden kaynaklanan habis bir neoplazmdir. Kadınlar arasında en sık görülen ikinci kanser olmakla birlikte, özellikle kanser ileri aşamada teşhis edildiğinde 20 ila 39 yaşları arasındaki kadınlarda kanser ölümünün önde gelen sebeplerinden biridir [1].

2021'de tahmini 14.480 invaziv rahim ağzı kanseri vakaları teşhis edileceği ve ABD'de yaklaşık 4.290 ölüm meydana geleceği tahmin edilmiştir. Rahim ağzı kanseri görülme oranı 1970'lerin ortalarından bu yana Pap ile taramanın yaygınlaşması nedeniyle 50% den fazla oranda düşmüştür. Araştırmalar, genç kadınlarda görülme

sıklığındaki son düşüşler HPV aşısı alımı ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşmıştır [2]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, 13 HPV tipinin rahim ağzı kanserine neden olabileceğini ve bu türlerden birinin vulva, vajina, penis, anüs ve belirli baş ve boyun kanserlerine (özellikle orofarenks dâhil boğazın arkası, dilin tabanı ve bademcikler) neden olabileceğini bulmuştur. Genital siğillere neden olabilecek HPV türleri, kansere neden olabilecek türlerle aynı değildir. Yüksek riskli HPV tipleri arasında, servikal kanserlerin yaklaşık % 70'ine neden olan tipleri HPV 16 ve HPV 18 dir.

Moleküler etkileşim verileri ve farklı omik veri setleri, bir hastalığa bağlı olan aday genlerin tüm genom, metilom, transkriptom, proteom ve metabolom düzeyinde değerlendirilmesi için etkin olarak kullanılabilir. Bu veriler biyolojik sistemi bir bütün içinde anlayabilmemiz için büyük bir potansiyel taşır. Farklı kanserlerde, genom, transkriptom, proteom ve metabolomun etkili kombinasyonunun moleküler mekanizmayı keşfetmek veya diyagnoz/prognoz biyobelirteçleri belirlemek için sistem biyolojisi yaklaşımlarının kullanılmasının önemi daha önceki çalışmalarda kullanılmıştır [3]. Benzer şekilde, omik veriler rahim ağzı kanseri gelişimi ve ilerlemesinin moleküler mekanizmasını keşfetmek için de kullanılmıştır. Bir çalışmada rahim ağzı kanserinde prognozun biyobelirteçlerini ve tedavi sonucunu belirlemek için dokulardan DNA mikrodizin analizi yapılmıştır. Hastalarda ortak yollar veya hedefler rahim ağzı kanserinde genom, transkriptom, proteom yaklaşımları ile tanımlanabileceği söylenmiştir. Örneğin, p16 ekspresyon seviyesinin, dokudan alınmış örneklerle uygulanan mikrodizi analizi ile aşağı regüle edildiği bulunmuştur [4]. Bir başka çalışmada ise sağlıklı ve kanser dokuların gen ekspresyon profillerine bakılarak ekspresyon seviyesi değişen genler belirlenmiş ve çalışmanın en önemli bulgusu, CDK1, CDK2 ve PLK1'in rahim ağzı kanserinin gelişimi ve invazyonunda yer alan bütüncü genetik ağların modüle edilmesinde kritik roller oynamasıydı. Bu merkez genler, rahim ağzı kanserin patogenezi iyileştirmeye yardımcı olabilir ve rahim ağzı kanserinin tedavisi için bir tanı belirteci olarak hizmet edebileceği sonucuna varılmıştır [5]. Öte yandan, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ile ilgili de birçok sistem bazlı çalışma mevcuttur. İlaç yeniden konumlandırma ya da başka deyişle ilaç repozisyonu olarak bilinen yöntem, piyasada mevcut bir ilacın başka bir hastalığın tedavisi için kullanılabilirliğini araştıran ve son zamanlarda ilaç endüstrisi tarafından büyük ilgi görmüş bir çalışma alanıdır. Kemoterapötik ajanlar, kanserli hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan kötü yan etkilere sahiptir. Bu açıdan ilaç repozisyonu, insan sağlığı için tolere edilebilen yan etkilerin yanı sıra anti-kanser aktivitesine sahip olan ama kanser tedavisinde henüz kullanılmayan ilaçları tanımlamak için ümit vaat eden bir strateji olarak görülür [6].

Literatürde bugüne kadar gerçekleştirilen rahim ağzı ile ilişkili sistem biyolojisi temelli çalışmaların geneli

değerlendirildiğinde, transkriptomik düzeyindeki çalışmaların olduğu görülmektedir. Fakat, yüksek riskli HPV tipleri arasında yer alan rahim ağzı kanserlerin yaklaşık % 70'ine neden olan tipler HPV 16 ve HPV 18 alt-tiplerinin mRNA düzeyinde analizlerinin bütüncül bakış açısı ile değerlendirilmesi ve hedef genlerinin yüksek giriş çıkışlı fonksiyonel analizi mevcut değildir. Benzer şekilde HPV kaynaklı rahim ağzı kanseri için ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları [7,8] literatürde az olmakla birlikte alt-tip özgü bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, her iki alt-tip için farklı deneysel platformlardan elde edilen veri setleri toplanmıştır. Rahim ağzı kanserli dokulardan alınıp, analiz edilmiş yüksek boyutlu işlevsel verilerin ileri istatistiksel analizi gerçekleştirilerek elde edilen ortak ekspresyon farklılığı gösteren sonuçlar, insan protein etkileşim ağı ile bütüncülleştirilmiştir. Her bir veri setinin zenginleştirme analizleri yapılarak hastalıkla ilgili yollar belirlenmiş ve ayrıca işaretçi reseptör, transkripsiyon faktörleri ve miRNA adayları da her iki alt-tip için belirlenmiştir. Her iki alt-tip için ayırıcı biyobelirteçler sunularak, hassas tıp uygulaması olabilecek alt-tip özgü teşhis ve tedavi yöntemleri sunma konusunda moleküler hedefler sunulmuştur. Ek olarak, ağ bazlı bir yaklaşımla ilaç yeniden konumlandırılma yapılmış ve alt-tip özgü ilaçlar listelenmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmanın amacına uygun transkriptom veri setleri, hastalıklı örneklerle karşılık sağlıklı bireylere ait gen ekspresyon verileri de içermelidir. Bu gereksinimi karşılayacak nitelikte veri setleri veri bankalarından elde edilebilmektedir.

İncelenen rahim ağzı kanser türüne ait beş mRNA gen ekspresyon (transkriptom) veri seti GEO [9] ve ArrayExpress [10] veri bankalarından hali hazırda elde edilmiştir. Analiz için seçilmiş ilk veri seti listesi; veri setlerinin numarası, HPV16 ve HPV18 enfekte örnek sayısı, platform bilgisini içerecek şekilde sunulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Önerilen projede kullanılacak veri setlerine ait örnek sayıları ve mikrodizin platform bilgisi

Veri Seti Numarası	Sağlıklı Örnek Sayısı	HPV16 ile Enfekte Örnek Sayısı	HPV18 ile Enfekte Örnek Sayısı	Platform
GSE9750	21	19	3	HG-U133A
GSE7803	10	10	4	HG-U133A
GSE6791	8	8	3	HG-U133_Plus_2
GSE52903	17	55	-	HuGene-1_0-st
GSE39001	5	19	-	HuGene-1_0-st

2.2. Yöntem

2.2.1. Rahim ağzı kanseri alt-tiplerine mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerin tespiti

Sağlık ve hastalık koşulları karşılaştırıldığında, ekspresyonunda farklılık gösteren genlerin (DEG) bulunması için her veri seti bağımsız olarak R/Bioconductor (www.bioconductor.org) yazılım platformu altında istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz süresince, RMA normalizasyonu [11] ve mikrodizin verileri için linear modeller (LIMMA) [12] metodu kullanılmıştır. Çoklu hipotez testleri gereğince p-değerlerinin düzeltilmesi FDR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir ve her veri setinin istatistiksel analizi sonrası ekspresyonda farklılık gösteren genler bulunmuştur. Klasik yaklaşım olan standart p-değer sınırları yerine, volkano çizgeleri ile istatistiksel anlamlılık iki boyutta (p-değeri ve kat değişimleri) belirlenmiştir.

Kullanılan adj-p değeri için üst sınırı maksimum 0.05, kat değişiminin logaritmasında alt-sınır %50 değişim olarak dikkate alınmıştır. Gen anlatımındaki değişikliğin yönü (gen anlatımı artan/azalan) belirlenecektir. Genlerin isimlendirmeleri (gene symbol, Entrez Gene ID, Affy ID vs.) ile ilgili değişiklik yapılması gerektiğinde “AnnotationDbi” [13] R paketi kullanılmıştır. Sonrasında her alt-tip için ekspresyon seviyesi değişiklik gösteren ortak genler belirlenmiştir.

2.2.2. Biyolojik Proses ve Yolakların belirlenmesi

Ekspresyonunda farklılık gösteren genlerin yolizi, hastalık ve gen ontoloji (GO) zenginleştirme analizleri, METASCAPE biyoinformatik aracı üzerinden gerçekleştirilmiştir [14]. Her alt-tipe ait ortak genlerden sadece o alt-tipte DEG çıkan genler ayrıca DAVID [15] zenginleştirme aracı kullanılarak, yolizi ilişkili veri bankaları olan KEGG; moleküler fonksiyon, biyolojik proses ve hücresel kopartman bilgisini içeren gen ontoloji terimleri (GOterm); hastalık ilişkisi kuran GAD ve OMIM gibi bilinen, halka açık veri bankalarından bilgiyi çekerek analiz edilmiştir. Zenginleştirme analizlerinde p-değeri 0.05 ‘ten küçük olanlar, istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.2.3. Protein-protein etkileşim ağlarının yeniden yapılandırılması ve topolojik analizi

Proteinlerin fiziksel etkileşimleri ağlarının yeniden yapılandırılması ile rahim ağzı kanserinin iki temel alt tipi (HPV16 ve HPV18 kaynaklı kanser) için çekirdek (hub) genleri ve onlarla etkileşim halinde olan proteinler belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, BIOGRID version 4.2 [16] kullanılmış ve sadece fiziksel etkileşimi olan protein-protein etkileşim listesi kullanılmıştır. Yönlendirilmemiş protein-protein etkileşimi (PPIs), ekspresyonu her alt-tip için ekspresyon seviyesi değişiklik gösteren ortak proteinler

etrafında kurulmuş ve sonrasında Cytoscape (v3.5.0) kullanılarak ağ yapısı görselleştirilmiştir [17]. Hub proteinlerini belirlemek için, Cytohubba eklentisi [18] kullanılarak topolojik analizler yapılmıştır. Bir yerel metrik (degree) ve bir global metrik (betweenness) olmak üzere eş zamanlı çift metrik yaklaşım [19] ile ağ topolojisi incelenmiştir. Bu metrikler skorlarına göre sıralanmış ve her iki alt-tip için ilk 20 protein hub protein olarak kabul edilmiştir.

2.2.4. İşaretçi transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve miRNA'ların tanımlanması

İşaretçi molekül algoritması [3] MATLAB (R2010) programı vasıtasıyla, ekspresyonunda farklılık gösteren genler baz alınarak işaretçi reseptörleri, transkripsiyon faktörleri (TF) ve miRNA'ları tanımlamak için kullanılmıştır. İşaretçi TF ve miRNA'lar ile onların etkileşim içinde olduğu proteinlerin belirlenmesi için düzenleyici ağlardan (TF-hedef geni ve miRNA-hedef gen etkileşimlerini temsil eden) yararlanılmıştır. Eşik değer olarak ise p-değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.2.5. İlaç Yeniden Konumlandırma

İstatistiksel analizlerle desteklenen transkriptomik güdümlü bir ilaç yeniden konumlandırma aracı olan geneXpharma [20], 15 farklı veri tabanını birleştiren Drug Gene Interaction Database (DGIDb 2.0) [21] veri bankasından kapsamlı ilaç-gen etkileşim verisini kullanarak, gen ifadesine dayalı bir ilaç yeniden konumlandırma analiziyle rahim ağzı kanserinin de içinde bulunduğu 48 hastalık için ilaç adayları sunmaktadır. geneXpharma, 48 hastalık için 118 hastalığa özgü gen ekspresyonu profil veri setini, gen-hastalık ve ilaç-hastalık ilişkileri için istatistiksel değerlendirmeleri içermektedir. geneXpharma, mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler üzerinden ilaçların o veri setindeki ilaç-gen etkileşimi için de p-değeri atamaktadır.

İstatistiksel bağlantı yöntemi [22], gen ekspresyon verisine uyarlanarak ilaç-veri seti ilişkilerinin öngörülmesinde kullanılmıştır. Bir ilacın hastalık veri seti ile ilişkisi, Eşitlik (1) de gösterilen hipergeometrik olasılık yoğunluk fonksiyonu kullanılarak yapılan istatistiksel bir test ile belirlenir.

$$P_{\alpha,\beta} = \frac{\binom{m}{x} \binom{N-m}{n-x}}{\binom{N}{n}} \quad (1)$$

Bu noktada, p α , β ilaç α 'nın veri kümesi, β ile ilişkisinin tahmini olasılığını açıklar. N, veri kümesi β 'daki prob sayısıdır; m ise veri kümesi β 'daki toplam anlatım farklılığı gösteren gen sayısıdır. n, bütün ilaç-ilaç etkileşimleri hesaba katıldığında ilaç α ile etkileşime giren genlerin sayısıdır; x ise, veri seti β 'da ilaç α ile etkileşime giren genlerin sayısıdır. Kısaca, m / N insan genomu içerisinde hastalığa bağlı genlerin

oranını ve x/n ilaç α ile etkileşime giren, ancak veri seti β ile ilişkili olan genlerin oranını yansıtır. Aynı prosedür, ilacın en az bir etkileşimi de dahil olmak üzere her olası ilaç veri kümesi çifti için tekrar edildi.

Bulunan ilaçlara ait hipergeometrik p- değeri eşiği olarak 0.001'den küçük ilaçlar çalışmaya dâhil edilmiştir.

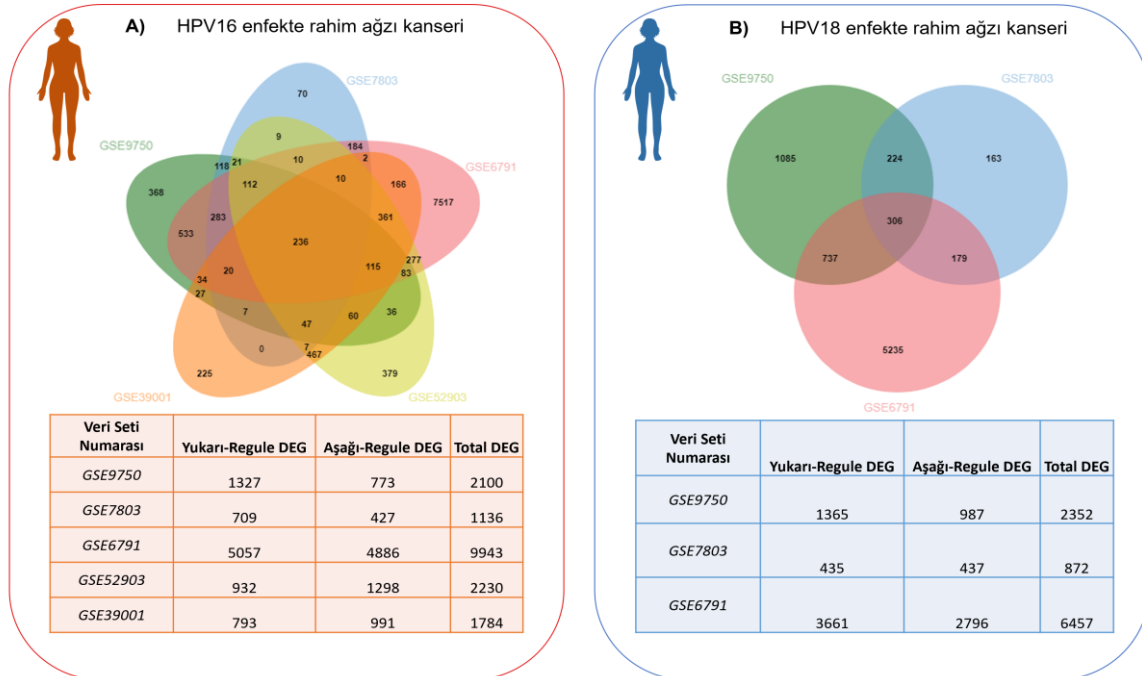
III. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Anlatımı Değişen Genler

HPV-16 enfekte rahim ağzı kanserine sahip hastalara ait bilgilerin olduğu 5 veri seti bulunmuş iken, HPV-18 enfekte rahim ağzı kanserine sahip hastalara ait bilgilerin olduğu 3 veri seti bulunmuştur. Her bir veri setinin tek tek istatistiksel analizi yapılarak anlatımı azalan ve artan genler belirlenmiştir (Şekil 1). HPV-16 enfekte veri setleri analiz edildiğinde en çok DEG

bulunan veri seti GSE6791, 5057 artan ve 4886 azalan gen ifadesi ile tespit edilmiştir. Anlatımı değişen gen sayısı en az olan veri setinde ise 709 artan, 427 azalan gen ifadesi tespit edilmiştir. Analiz edilen 5 veri setinde ise ortak DEG sayısı 236 tanedir (Şekil 1A). GSE6791 ve GSE7803 dışındaki verisetlerinden elde edilen sonuçlar ortalama 2000 DEG ile birbirine daha yakın bulunmuştur.

HPV-18 enfekte veri setleri analiz edildiğinde ise en çok DEG bulunan veri seti yine GSE6791 olarak bulunmuştur. 3661 artan ve 2796 azalan gen ifadesi ile tespit edilmiştir. Anlatımı değişen gen sayısı en az olan veri seti GSE7803 analizinde ise 435 artan, 437 azalan gen ifadesi tespit edilmiştir. Analiz edilen 3 veri setinde ise ortak DEG sayısı 306 tanedir (Şekil 1B). HPV-18 enfekte veri setlerindeki sonuçlarda DEG sayıları oldukça farklı çıkmasına rağmen ortak genler belirlenebilmiştir.



Şekil 1. İstatistiksel analizler sonucunda **A)** HPV-16 enfekte rahim ağzı kanseri veri setlerinde anlatımı değişen genler, **B)** HPV-18 enfekte rahim ağzı kanseri veri setlerinde anlatımı değişen genler

Alt-tip özgü ortak gen setleri belirlendikten sonra yine çıkan genler incelendiğinde ortak 102 DEG olduğu görülmüştür (Şekil 2A). Tüm veri setlerinden elde edilen sonuçlarda (Ek Tablo 1) her iki alt-tip için incelendiğinde ve ortak çıkan genler analiz dışında bırakıldığında bulunan genler, birbirinden bağımsız farklı veri setlerinin analizi sonucunda bulunduğu için bu gen setleri hastalığın alt-tiplerine ait ayırıcı bilgi vereceği ön görülmektedir.

3.2. HPV-16 ve HPV-18 Kaynaklı Rahim Ağzı Kanserleriyle İlişkilendirilen Sinyal Yolakları

İlişkili sinyal yolakları bulunur iken her iki alt-tipin kendi veri setleri arasında ortak olan HPV16 grubundan

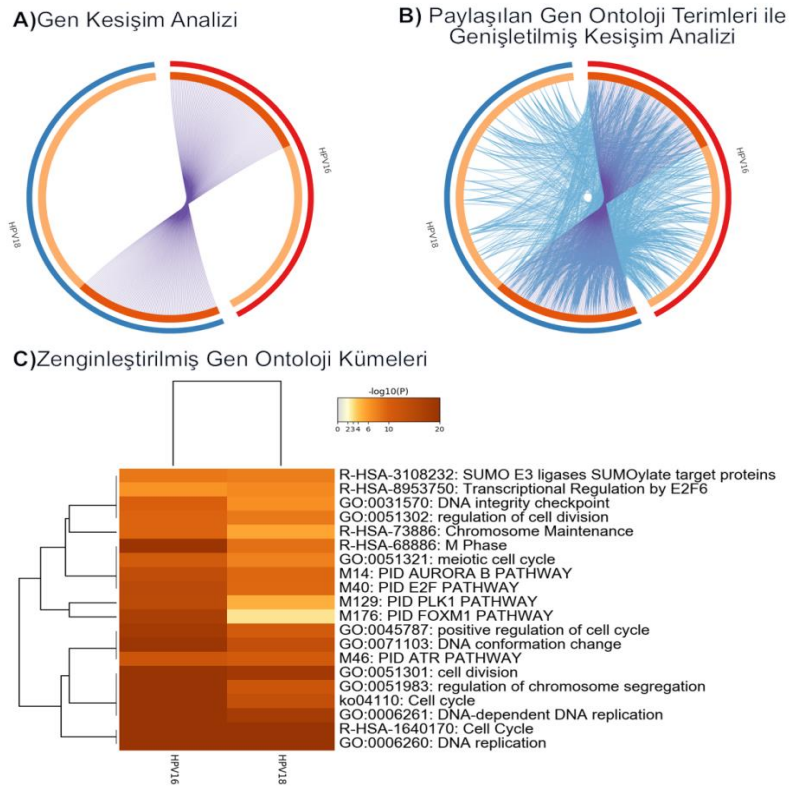
236 gen ile HPV18 grubundan 306 genin kesişim kümesi ele alınmıştır. İki alt-tipte anlatımı değişen ortak 102 gen olduğu belirlenmiştir (Şekil 2A). Bu ortak genlerin biyolojik olarak anlamlandırılabilmesi için zenginleştirme analizleri yapılmıştır. METASCAPE üzerinden yapılan zenginleştirme analizleri, alt-tiplere ait özgün genler olmasına rağmen, bu genlerin çoğunlukla ortak yolaklarda veya benzer fonksiyonlarda olduğunu göstermiştir (Şekil 2B).

Bulunan yolaklar ve GO terimleri genellikle hücre döngüsü ve bölünmesi ile ilgili hücresel yolak ve süreçlerdir. DNA replikasyonu, hücre döngüsü, mayoz bölünme, hücre bölünmesi, hücre bölünmesinin düzenlenmesi gibi yolaklara ek olarak SUMOlama

hedef proteinleri, AURORA B, E2F, PLK1, ATR ve FOXM1 yolakları da istatistiki olarak anlamlılığı en yüksek ilk 20 yolak şeklinde tespit edilmiştir (Şekil 2C).

Ayrıca alt-tiplere özgü genlere odaklanıp, aktifleşen yolakları belirlemek amacıyla DAVID biyoinformatik programı kullanılarak anlatımı değişen genlerin rol aldığı yolaklar da belirlenmiştir. KEGG yolaklarına bakıldığında, HPV18 özgü genlerin kronik miyeloid lösemi ve Fc gamma R odaklı fagositoz yolaklarının $p < 0.05$ olduğu görülmüştür. Öte yandan, HPV16 özgü genler oosit mayozu, progesterone odaklı oosit maturasyonu, Fanconi anemi yolağı, p53 sinyal yolağı ve HTLV-1 enfeksiyonu olduğu görülmüştür. Özgü genler üzerinden zenginleştirme analizi yapılmış olsa

da GO moleküler fonksiyonlara bakıldığında ortak gruplar olduğu görülmüştür. Farklı genlerin aynı fonksiyonu paylaştığı sonuçlar arasında protein, enzim ve kromatin bağlanma fonksiyonları yer almıştır. Sadece HPV-16 özgü gruptaki genlere ait fonksiyonlar protein kinaz, tek sarmal DNA tübülün ve identik protein bağlanması, histon kinaz aktivitesi ve siklin bağımlı protein serin/treonin kinaz aktivitesi olarak görülmüştür. Sadece HPV-18 özgü gruptaki genlere ait fonksiyonlar ise çift sarmal DNA, ubiquitin protein ligaz, poli A RNA, mRNA, ubiquitin, integrin, reseptör bağlanmaları ve nükleositoloplasmik taşıyıcı veya ubiquitin konguje enzim aktivitesi gibi sonuçları kapsamaktadır (Ek Tablo 2).



Şekil 2. Zenginleştirme analizi sonuçları A) İki alt-tipte ortak olan genlerin gösterimi B) İki alt-tipte anlatımı değişen genlerin ait oldukları gen ontoloji terimlerinin kesişim analizi C) İki alt-tipte de görülen zenginleştirilmiş gen ontoloji kümeleri

3.3. HPV-16 ve HPV-18 Kaynaklı Rahim Ağzı Kanserlerinde Protein Etkileşim Ağı

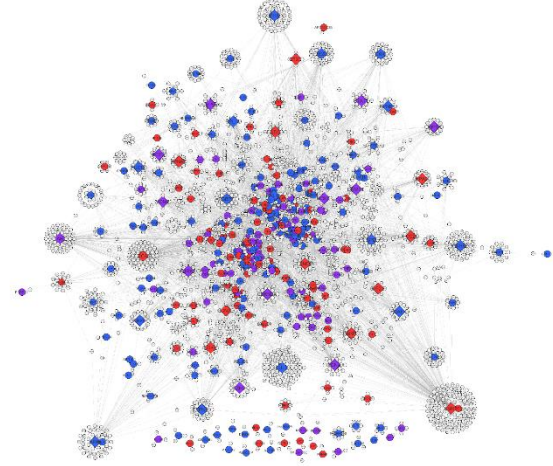
Metot kısmında belirtilen, proteinler arasında fiziksel etkileşimin olduğu protein- protein etkileşim ağı kullanılarak alt-tiplerde ortak olan genlerin eksprese ettiği proteinler etrafında ilk komşuları alınarak etkileşim ağı kurulmuştur (Şekil 3). HPV-16 alt-tipinde ortak genlerin eksprese ettiği 236 protein ve komşuları arasında 3497 etkileşim bulunmuş iken; HPV-18 alt-tipindeki ortak genlerin eksprese ettiği 306 protein ve ilk komşuları arasında 4311 etkileşim olduğu bulunmuştur.

Protein-protein etkileşim ağları sinyalizasyon ve hücrel proseslerin gerçekleşmesi için önemli işlemlerdir. Bu açıdan bakıldığında geniş ağların oluşması ön görülmekte ve “hub” protein denilen çekirdek proteinlerin de bu ağlarında merkezinde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir.

Her iki alt-tip için metotta belirtildiği üzere topolojik analizler yapılmıştır. Bir yerel metrik (degree) ve bir global metrik (betweenness) olmak üzere eş zamanlı çift metrik yaklaşım ile ağ topolojisi incelenmiştir. Degree yani Derece diye adlandırılan metrik, temel olarak o proteinin diğer proteinlerle etkileşim sayısını

vermektedir. *Betwenness* ise Türkçe'ye Arasındalık Merkeziliği olarak geçer ve bir proteinin diğer proteinler arasında geçiş/köprü konumunda olma düzeyini belirlemeyi amaçlar. Hesaplanan Derece merkeziliği ve Arasındalık merkeziliği ile ilgili elde edilen skorlar Tablo 2'de sunulmuştur. İki metrikte de ortak olan ve tekrarlanan proteinler çıkarıldığında, iki alt-tip için de 25'şer hub protein olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2'de belirtilen hub proteinlerden iki alt-tipte de ortak olan 8 protein şöyledir: androjen reseptör (AR), Aurora Kinaz A (AURKA), Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (BRCA1), Sikline bağlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), Zeste homolog 2'nin güçlendiricisi (EZH2), bir proto-onkogen (MYC), Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ve Transkripsiyon 1'in sinyal transdüseri ve aktivatörü (STAT1). Bunların dışında kalan diğer 17'şer protein ise alt-tiplere özgü hub proteinler olarak bulunmuştur (Ek Tablo 3).



Şekil 3. Alt-tiplere ait veri setlerinde ortak proteinlere ait geniş protein-protein etkileşim ağı. Mavi renk HPV16 özgü; kırmızı renk HPV18 özgü; mor renk ortak ve dörtgen şeklinde olan proteinler ise hub proteinlerdir.

Tablo 2. HPV-16 ve HPV18 enfekte alt-tiplerde hub proteinlerin topolojik özellikleri

HPV-16 enfekte grupta ortak genler				HPV-18 enfekte grupta ortak genler			
Diğer proteinlerle etkileşim sayısı		Arasındalık Merkeziliği		Diğer proteinlerle etkileşim sayısı		Arasındalık Merkeziliği	
Hub protein	Skor	Hub protein	Skor	Hub protein	Skor	Hub protein	Skor
ESR1	356	ESR1	1097417	AR	150	AR	708715.8
BRCA1	266	BRCA1	1024326	CUL3	133	YWHAZ	561531.1
AR	150	AR	342464	PCNA	120	CUL3	532139.7
PCNA	120	PCNA	260345.9	YWHAZ	114	PCNA	469825.9
PARP1	108	PARP1	248436.5	UBE2D3	103	APP	464536.8
EZH2	97	EZH2	243805.4	EZH2	97	EGFR	454908.3
CDK1	77	AURKA	191646.9	APP	91	BRCA1	441452.1
RAD51	71	PSMD2	180511.2	IFI16	90	HSPD1	412392.5
CDKN2A	68	CDK1	168307.7	H2AFX	83	UBE2D3	393295.3
AURKA	67	CDC20	145950.9	HSPD1	76	IFI16	368855.2
CDC20	67	CDKN2A	139946.1	RPL14	69	KPNB1	305044.4
PSMD2	66	RAD51	129355.6	RBBP7	69	EZH2	302530.8
CBX3	56	MYC	127588.2	CDKN2A	68	H2AFX	284296
RPA2	56	KIF23	126171.2	AURKA	67	CDKN2A	233861.9
MCM2	54	ECT2	124068.2	CBX5	67	AURKA	232550.1
STAT1	53	KPNA2	122212.1	SUZ12	64	MYC	221538.3
MCM7	51	RNPS1	121272.5	PTPN11	64	CBX5	205146.6
DNMT1	48	CEP55	119778.6	RPL10A	63	RBBP7	199167.1
CCNA2	47	CBX3	118746	RPL15	62	STAT1	192784.2
RNPS1	45	STAT1	116440.7	CRK	61	PTPN11	186636.8

3.4. HPV-16 ve HPV-18 Kaynaklı Rahim Ağzı Kanserlerinde İşaretçi transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve miRNA'lar

Transkripsiyonel düzenleyici elemanlar olan transkripsiyon faktörleri (TF) veya mikroRNA'lar (miRNA) biyolojik yollardaki transkripsiyonel

ifadeyi kontrol eden elemanlardır. Rahim ağzı kanserinin alt-tiplerine ait hub genlerin büyük çoğunluğunun, insan transkripsiyonel düzenleyici ağ elemanı olmaları da bu sebeple şaşırtıcı değildir. HPV-18 enfekte rahim ağzı kanserleri için incelenen 3 veri setinde ortaya çıkan transkripsiyon faktörleri ve miRNA'ların sayıları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. HPV18 enfekte kanser hastalarında işaretçi transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve miRNA'lar

Veri seti Numarası	TF	miRNA
GSE6791	13	173
GSE7803	14	164
GSE9750	14	128
Ortaklık	13	91

HPV-16 enfekte hastalara ait incelenen 5 veri setinde ortaya çıkan transkripsiyon faktörleri ve miRNA'ların sayıları Tablo 4'de verilmiştir. Veri setlerinin kendi içinde ortaklıkları incelenmekle birlikte, iki alt- tip arasında ortak olan ifadeler de incelenmiştir. Sonuçlara göre iki alt-tipte de tüm işaretçi TF'lerin (ETS1, GATA2, AR, YBX1, FOXP3, GATA1, PRDM14, E2F4, ESR1, GATA3, TFAP2C, FOXA1) aynı olduğu, sadece HPV-18 enfekte grupta ek olarak, Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF1A) olduğu bulunmuştur. miRNA'lara bakıldığında ise HPV-16 enfekte grupta 11 tane çıkan işaretçi miRNA'ların 9 tanesi (hsa-miR-124-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-let-7c-5p) HPV-18 işaretçi miRNA listesinde de gözlenmiştir. HPV-16 özgü sadece hsa-miR-101-3p ve hsa-let-7d-5p bulunmuştur. HPV18 enfekte gruba özgü ise 81 miRNA vardır (Ek Tablo 4).

Tablo 4. HPV16 enfekte kanser hastalarında işaretçi transkripsiyon faktörleri ve miRNA'lar

Veriseti Numarası	TF	miRNA
GSE6791	13	172
GSE7803	14	135
GSE9750	14	152
GSE39001	13	168
GSE52903	13	167
Ortaklık	12	11

3.5. HPV-16 ve HPV-18 Kaynaklı Rahim Ağzı Kanserlerinde İlaç Yeniden Konumlandırma

Dünyada, farklı hesapsal yöntemlerin kullanılarak ilaç repozisyonu yapılmasına olanak sağlayan halka açık veri tabanları olduğu gibi [6], ülkemizde de ilk olarak, halka açık, web erişimli, transkriptomik / gen ekspresyonu kılavuzlu yeni bir ilaç arama motoru olan GeneXpharma (<http://www.genexpharma.org>) tasarımını grubumuzda raporlanmıştır [20]. GeneXpharma, yedi farklı hastalık kategorisinde 48 hastalık için istatistiksel olarak değerlendirilmiş gen ifadeleri ve bunların ilaç etkileşimlerini sağlayan kullanıcı dostu bir arayüze sahip, ücretsiz bir platformdur. GeneXpharma, hastalık-gen-ilaç üçlüsü üzerine kurulu hipotezler üretmek üzere tasarlanmış ve düzenlenmiştir. Böylece hangi ilaçların potansiyel olarak hangi hastalıklara karşı kullanılabileceğini ön gören, biyoinformatik/kodlama bilmeyen hekim, biyolog, onkolog gibi araştırmacılara yön vermek için kullanılabilecek bir arama motorudur. GeneXpharma kullanılarak, prostat kanser tedavisi için zenarestat

[20]; baş ve boyun kanseri tedavisi için ise rosiglitazone, risperidone, clocortolone [23] gibi ilaçlar tedavi için önerilmiştir.

Bu çalışmada da hub proteinler üzerinden ilaç yeniden konumlandırma yapılmıştır. Hub proteinlerden de ortak olan veya TF fonksiyonu gösteren hub genler filtrelenmiş ve sadece HPV'nin iki alt-tipinde özgü proteinlerin ve o alt tipin özgü ilaçların olduğu sonuçlar alınmıştır (Ek Tablo 5). HPV-16 alt tipi için 6 hub protein (CDK1, DNMT1, MCM2, MCM7, PSMD2, RAD51) ve 45 ilacın/ilaç grubunun etkileşimini içeren 50 etkileşim; HPV-18 alt tipinde ise 3 hub protein (EGFR, APP, PTPN11) ve 165 ilacın/ilaç grubunun etkileşimini içeren toplam 165 etkileşim ağı önerilmiştir. HPV-16 alt-tipi için CDK inhibitörleri ön plana çıkarken, HPV-18 alt-tipi için ilişkili çıkan ilaçların genellikle EGFR inhibitörleri, anti-depresanlar, interferonlar gibi gruplardan olduğu bulunmuştur. HPV-18 özgü ilaçların sonuçları, şaşırtıcı olarak, vitamin A, vitamin E veya zerdeçal gibi doğal moleküllere uzanan geniş bir sonuç havuzu sunmuştur. Ayrıca her iki alt-tipte de ortak olmayan ama yine de kanser tedavisinde kullanılan HPV-16 listesinde cyclophosphamide, ifosfamide, busulfan, azacitidine, pemetrexed, decitabine temozolomide, vincristine, doxorubicin; HPV-18 listesinde ise pazopanib, rituximab, trastuzumab, olaparib dasatinib, fulvestrant, imatinib vemurafenib gibi kemoterapötik ilaçlar listelenmiştir. Doğrudan kanser tedavisinde kullanılmayan ve alt-tiplere özgü olan ilaçlar ise yeniden konumlandırma adayı olarak sunulmuştur. Örneğin, HPV-16 enfekte kanser tedavisi için anti-inflamatuvar bir ilaç olan ibuprofen ve anti-aritmi tedavisinde kullanılan procainamide ilaçları önerilmiştir. HPV-18 enfekte kanserler için ise vazodilatör olan hidralazine ve Alzheimer tipi demansın semptomatik tedavisi için kullanılan NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör antagonisti olan memantin önerilen ilaçlardandır.

3.6. Tartışma

Rahim ağzı kanserinin oluşmasına sebep olan onkojenik HPV enfeksiyonları arasında en yaygın görülenleri HPV16 ve HPV18 kaynaklıdır. Bunun bir sonucu olarak, bu alt-tiplerin hastalığın patogeneğinde rol oynayan genetik ve çevresel faktörlerinin tanımlanması, moleküler mekanizmaların aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Rahim ağzı kanserinde artan insidans ve yüksek ölüm oranına ilişkin istatistiklere göre, rahim ağzı kanseri için yeni tanı ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple, etkili diyagnostik veya prognostik biyobelirteçlerin belirlenmesi, terapötik hedeflerin araştırılması ve etkili ilaç yeniden konumlandırma stratejileri önem arz etmektedir. Bu süreç boyunca da alt-tiplere ait çalışmaların yapılması, kişiselleştirilmiş tip uygulamalarına giden yolda bir ara basamak olup, etkili bir hassas tıp uygulamasıdır.

Son on yılda, rahim ağzı kanserinin moleküler mekanizmasını anlamak için önemli araştırmalar yapılmıştır. Ancak, hastalığın alt-tiplerine özgü ve etkili biyobelirteçler mevcut değildir çünkü çoğu çalışmada tek bir biyobelirteç üzerine odaklanıp, bütüncül olarak bir etkileşim ağı seviyesinde inceleme yapmamıştır. Öte yandan, farklı omik seviyelerdeki biyolojik verilerin biyomoleküler ağlarla entegrasyonunu sağlayan sistem biyolojisi çalışmaları bu açığı kapatmak üzere uygulanmaktadır [24–27]. Sistem biyolojisi perspektifinden yapılan çalışmalarda özellikle kanser gibi kompleks hastalıklarda hastalığın alt-tiplere ayrılması ve bu alt-tiplere özgü biyobelirteç veya ilaç hedefi belirlenmesi gelecek vadede bir konudur [28].

Bu çalışmada, rahim ağzı kanserine ait HPV-16 ve HPV-18 enfekte iki alt-tipin bağımsız veri setlerinde analiz ederek, gen ekspresyonunun bir meta-analizini gerçekleştirilmiştir. İki alt-tip içinde rahim ağzı kanserinin temel DEG'leri belirlenmiş ve bu bilgileri kapsamlı insan biyomoleküler ağları (protein-protein etkileşim ve transkripsiyonel düzenleme ağı) ile entegre edilmiştir. Tanıda kullanılacak moleküler belirteçler, ilaç hedefleri tespit edildiği gibi ilaç yeniden konumlandırma ile de alt-tiplerde kullanılacak farklı ilaçla önerilmiştir.

Önceki yıllarda yapılmış olan bir meta-analizde, rahim ağzı kanserindeki önemli genleri araştırmak için üç mRNA mikrodizi veri setini kullanılmıştır. Ayrıca, bu etkileşen genler, bir protein-protein etkileşim ağı ile netegre edilerek kullanılmıştır. RhoB (Ras homolog aile üyesi B), stathmin 1 ve siklin D1'in servikal kanser ilerlemesinde anahtar genler olduğu bulunmuştur. Dahası, RhoB ve stathmin 1, serviks kanserinin tanı ve tedavisi için potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır [29].

Rahim ağzı kanseri transkriptom verilerinin meta-analizinin yapıldığı bir diğer çalışma [3], ortak gen setinin, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, p53 sinyal yolu, oosit mayozu ve olgunlaşması gibi temel biyolojik süreçleri ön plana çıkardığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da iki alt-tipte ortak genler, DNA replikasyonu, hücre döngüsü, mayoz bölünme, hücre bölünmesi, hücre bölünmesinin düzenlenmesi gibi benzer yolları ön plana çıkarmıştır. Farklı olarak, ortak gen seti yerine HPV16 özgü genler, oosit mayozu, progesterone odaklı oosit maturasyonu, p53 sinyal yolağını zenginleştirme analizi sonucu olarak sunmuştur.

Araştırmaya protein seviyesinde bakıldığında ise ortak çıkan hub proteinlerin (örneğin AR, MYC, BRCA1, PCNA, ESR1) sadece rahim ağzı kanserinde değil, başka birçok farklı kanser türünde de etkili olduğu gözlenmiştir [30]. BRCA1, ESR1 ve PCNA'nın rahim ağzı kanseri ile ilişkili olduğu zaten gösterilmiştir [31–34]. Daha önceki meta-analize benzer [3], bizim

çalışmamızda da ön plana çıkan sikline bağımlı kinazlar (CDKs), apoptoz, hücre bölünmesi, ağrı sinyali, RNA ekleme, nöronal hücre fiziolojisi ve insülin salım süreçlerinde görevlidir [35]. Önceki çalışmada belirtilen CDK1, bizim çalışmamızda sadece HPV-16 özgü bir hub protein olarak bulunmuş iken her iki alt-tipte de gözlenen CDKN2A'dır.

Rahim ağzı kanserin arkasındaki mekanizmaları araştıran bireysel gen ekspresyon çalışmalarına rağmen [36–40], bu hastalıkta aday biyobelirteçler veya terapötik hedefler olarak genleri, proteinleri ve miRNA'ları öngören sistem düzeyinde bütünleştirici analizler literatürde sınırlıdır. Bütünleştirici bir çalışma örneğinde, ekspresyonu farklılık gösteren genler (DEG'ler) ve transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) bağlanma alanlarının promotör sekanslarının bir analizi, E2F'yi kritik bir transkripsiyonel düzenleyici ve servikal kanser tedavisi için potansiyel bir moleküler hedef olarak önermiştir [41]. Başka bir çalışmada, miRNA'lar, miR-203 ve miR-30b ve hedef genler BIRC5, HOXA1 ve RARB, miRNA'ların ve hedeflerinin sistematik analizi ile ortaya konmuş ve hedeflerinin sistematik analizi ile ortaya konmuş ve rahim ağzı kanserinin patogeneğinde kritik oyuncular olarak önerilmiştir [42]. Ayrıca, insan protein etkileşim verileri ve rahim ağzı kanseri gen setlerini entegre ederek, rahim ağzı karsinogeneğinde yer alan birkaç yeni aday (örneğin, VEGFA ve IL-6) genleri de tahmin edilmiştir [43].

Bir araştırmada, miRNA mikrodizi yöntemini kullanılmış ve miR-188, miR-99, miR-125b'nin aşağı regüle edildiği, miR-223'ün ise rahim ağzı kanserinde yukarı regüle edildiğini bulmuştur. Bu miRNA ekspresyonu, servikal kanser hastalarının kısa süreli sağkalımı ile ilişkili olarak rapor edilmiştir [44]. Ek olarak, miR-17-5p'nin miRNA mikrodizi yoluyla servikal kanserde yüksek oranda eksprese edildiği doğrulanmıştır. Dahası, miR-17-5p'nin rahim ağzı kanserinde TGF-(dönüştürücü büyüme faktörü-beta) - reseptör 2'yi hedefleyerek hücre proliferasyonunu ve metastazı teşvik ettiği tanımlanmıştır [45].

Bir başka araştırma grubu, miRNA mikrodizi analizi ile rahim ağzı kanserinde belirgin şekilde ifade edilen miR-143 dahil olmak üzere 24 miRNA'yı tanımlamıştır. Dahası, rahim ağzı kanserinde miR-143'ün aşağı regülasyonu ve miR-143'ün aşırı ekspresyonu apoptozu indüklediği ve Bcl-2'yi hedefleyerek tümör büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir [28]. Başka bir çalışma, rahim ağzı kanserinde miR-203 dahil 15 farklı şekilde eksprese edilmiş miRNA tanımlamıştır [28]. MiR-195-5p'nin yetersiz ekspresyonu, servikal kanserde miRNA mikroarray analizi ile belirlenmiştir [28]. Derinlemesine araştırma yapıldığında ise miR-195-5p'nin MMP-14'ü hedeflediğini ve servikal karsinom hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve invazyonunu baskıladığını gösterdi, yani yetersiz ekspresyonunda kanser oluşma olasılığının arttığı bulunmuştur [28].

HPV-16 özgü çıkan miR-101, JAK yolağının inhibisyonu vasıtasıyla rahim ağzı kanser hücrelerinin çoğalmasını ve apoptozunu etkilediği gözlenmişti [46]. HPV-18 özgü miRNA'ların görece daha çok çıkmış olması dikkat çekici bir diğer sonuçtur. Bu alt-tipe özgü çıkan gen setinin transkripsiyonel düzenleyici ağlarda daha çok yer aldığı sonucunu çıkartmaktadır. Zaten, GO biyolojik proseslerde de HPV-18 özgü genlerinin daha çok regülasyon ile ilişkili proseslerde ön plana çıktığı görülmektedir (Ek Tablo 2).

Daha önceki meta-analizde rahim ağzı kanserinin çekirdek genlerinin transkripsiyonel ifadesinde öne çıkan TF'ler: E2F4, ETS1 ve CUTL1 olarak belirtilmiştir [3]. E2F4, hücre döngüsü ilerlemesinde çok önemli bir role sahiptir ve aşırı ekspresyonu, göğüs ve kolon kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca E2F4 mutasyonu endometriyal, prostat, kolorektal, mide ve ülseratif kolit ile ilişkili neoplazma ve mesane kanseri ile ilişkili bulunmuştur [47–49]. ETS1'in artan ekspresyonu ise çeşitli kanser türleri (örn., servikal, meme ve yumurtalık) ile ilişkilendirilmiştir [50]. CUTL1 ise ilk defa o çalışmada rahim ağzı kanseri ile ilişkilendirilmiş bir TF'dir [3]. İki alt-tipte de tüm işaretçi TF'lere (ETS1, GATA2, AR, YBX1, FOXP3, GATA1, PRDM14, E2F4, ESR1, GATA3, TFAP2C, FOXA1) bakıldığında diğer iki TF (ETS1 ve E2F4) bulunmuş, CUTL1 bulunamamış ve 12 adet işaretçi TF'in alt-tiplerde aynı oldukları görülmüştür. Sadece HPV-18 enfekte grupta ek olarak, Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF1A) olduğu bulunmuştur. Mevcut bir klinik çalışma ve meta-analiz, HIF-1 α aşırı ekspresyonunun rahim ağzı kanserinin düşük hayatta kalma süresi ile ilişkili olduğunu göstermiş ve HIF-1 α 'nın rahim ağzı kanseri için bir prediktör olarak önemini vurgulamıştır [51]. Fakat, ilk defa bu TF'in HPV18 enfekte rahim ağzı kanser hastaları için önemi bu çalışmada vurgulanmıştır.

Daha önce pek çok kanser için hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma çabaları olmasına rağmen [23,28,52], rahim ağzı kanseri için çok sayıda çalışma mevcut değildir. Var olan çalışmalarda ise [8,53] kullanılan metodolojiler hastalık heterojenliği ve alt tip bilgilerinden bağımsız olarak doğrudan rahim ağzı kanserine odaklanmıştır. İlk defa bu çalışmada HPV-16 ve HPV-18 enfekte hasta grupları ile ilgili transkriptomik veri ayrı ayrı çalışılmış ve ilaç yeniden konumlandırma yapılmıştır. HPV-16 alt-tipi için CDK inhibitörleri ön plana çıkarken, HPV-18 alt-tipi için ilişkili çıkan ilaçların genellikle EGFR inhibitörleri, anti-depresanlar, interferonlar gibi gruplardan olduğu bulunmuştur. HPV-18 özgü ilaçların sonuçları, şaşırtıcı olarak, vitamin A, vitamin E veya zerdeçal gibi doğal moleküllere uzanan geniş bir sonuç havuzu sunmuştur. Yeniden konumlandırılmış alt-tip özgü ilaçlar arasında çok sayıda kemoterapötik ajan da mevcuttur. Fakat, kemoterapötik ajanlar, kanserli hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan kötü yan etkilere sahiptir. Bu açıdan ilaç repozisyonu, insan sağlığı için

tolere edilebilir yan etkilerin yanı sıra anti-kanser aktivitesine sahip olan ama kanser tedavisinde henüz kullanılmayan ilaçları tanımlamak daha ümit vaat edicidir. Bu çalışmada, doğrudan kanser tedavisinde kullanılmayan ve alt-tiplere özgü olan ilaçlar ise yeniden konumlandırma adayı olarak sunulmuştur. Örneğin, HPV-16 enfekte kanser tedavisi için anti-inflamatuvar bir ilaç olan ibuprofen ve anti-aritmi tedavisinde kullanılan procainamide ilaçları önerilmiştir. HPV-18 enfekte kanserler için ise vazodilatör olan hidralazine ve Alzheimer tipi demansin semptomatik tedavisi için kullanılan NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör antagonisti olan memantin önerilen ilaçlardır. HPV-18 özgü ilaç listesi daha kapsamlı olduğu için makalede tek tek bahsetmek mümkün olmamıştır fakat HPV-18 özgü ilaç listesindeki adaylardan biri olan ribavirin daha önceki çalışmalardan birinde de bahsedilmiştir. *In vitro* analizler apoptozun indüklenmesi ve matris metalloproteinazlar salgılanmasının azaltılması ile HeLa hücrelerinin (ki HPV-18 enfekte bir hücre hattı örneği) canlılığının düşürüldüğünü göstermiştir. Aynı çalışmada, *in vivo* deneylerde tümör hacminde önemli düşüş gözlemlendiğini göstermiştir [8]. HPV-16 özgü grup için önerilen ilaçlar arasında az miktarda kanser ilacı olmayan örnek bulunmuştur. Bunlardan ibuprofen ve benzer bir ilaç olan celecoxib'in büyümeyi inhibe edebildiği ve rahim ağzı kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olabildiği bildirilmiştir [53].

3.7. Sonuç ve Değerlendirmeler

Sonuç olarak bu çalışmada, sistem biyolojisi yaklaşımları, rahim ağzı kanserinin en yaygın onkojenik iki türü olan HP-16 enfekte ve HPV-18 enfekte kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinin moleküler mekanizmasını keşfetmek için kullanılmıştır. Rahim ağzı kanserinde alt-tip özgü diyagnostik, prognostik ve ilaç hedefi olabilecek biyobelirteçlerini belirlemek için mikrodizi meta-analizi yapılmıştır. İlk olarak incelenen protein-protein etkileşimindeki hub proteinlerde iki alt-tipte de ortak olan 8 protein (AR, AURKA, BRCA1, CDKN2A, EZH2, MYC, PCNA, STAT) dışında, 17'şer protein alt-tiplere özgü hub proteinler olarak bulunmuştur. Transkripsiyonel düzenlemede önem arz eden TF ve miRNA'lar arasında işaretçi molekül algoritması ile ön plana çıkanlar bulunmuştur. TF'lerde alt-tipleri ayırt edebilecek belirgin farklılık gözlenmemekle birlikte, sadece HIF1 α HPV18 enfekte grubunda işaretçi TF bulunmuştur. HPV-16 özgü sadece hsa-miR-101-3p ve hsa-let-7d-5p bulunmuştur. HPV18 enfekte gruba özgü ise 81 miRNA vardır. Çalışmanın en sonunda ise hub proteinlerin bazılarını hedef alan ilaçlar üzerinden ilaç yeniden konumlandırma yapılmıştır. HPV-16 enfekte kanser tedavisi için ibuprofen ve procainamide ilaçları; HPV-18 enfekte kanserler için ise hidralazine ve memantin önerilen ilaçlardır. Çalışmadaki en büyük kısıtlayıcı etken ise veri setlerinin oluşturulduğu deneysel platformların farklılığıdır. Daha geniş bir popülasyon oluşturmak için birden çok veri seti analiz edilmesi

amaçlanmıştır. Fakat deneysel platformlardaki prob sayılarının farklılığı ekspresyonu değişen gen sayılarının birbirinden çok farklı olması ve ortaklıkların da görece az olmasına sebep olmuştur. Bu tarz bir yaklaşımın yeni nesil sekanslama ile yapıлып, tekrarlanması daha geniş bir ortaklık ve böylece altiplere özgü daha kapsamlı gen kümeleri sunabilir.

Yakın gelecekte, rahim ağzı oluşumunun moleküler temelini tanımlama ve yeni tedavi yöntemlerinin önerilmesi ile rahim ağzı kanserinin transkripsiyonel tıbbi etki etmek için yeni sistem biyolojisi yaklaşımlarının oluşacağı ön görülmektedir. Bu sebeple, hassas tıp uygulaması olarak kişiselleştirilmiş tıbbin bir adım öncesi alt-tıp özgü çalışmaların yapılmasıdır. Sistem biyolojisinin, büyük ölçüde rahim ağzı kanserinin patogenezi incelememize ve mevcut temel ve klinik çalışma için tanısal doğruluk, tahmin performansı ve etkili tedavi aramamıza yardımcı olacağı aşikardır. Yapılan tüm hesapsal önermelerin *in vitro* ve *in vivo* hastalık modelleriyle deneysel olarak validasyonunun sağlanması da büyük önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 119S999 numaralı TÜBİTAK 1002 Araştırma projesi kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. ve Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, 68(6), 394-424.
- [2] Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E. ve Jemal, A. (2021) Cancer statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, 71(1), 7-33.
- [3] Kori, M. ve Arga, K.Y. (2018) Potential biomarkers and therapeutic targets in cervical cancer: Insights from the meta-analysis of transcriptomics data within network biomedicine perspective. *PLoS ONE.*, 13(7), 1-27.
- [4] Lin, M., Ye, M., Zhou, J., Wang, Z.P. ve Zhu, X. (2019) Recent Advances on the Molecular Mechanism of Cervical Carcinogenesis Based on Systems Biology Technologies. *Computational and Structural Biotechnology Journal.*, 7(17), 241-250.
- [5] Mousavi, S.Z., Poortahmasebi, V., Mokhtari-azad, T. ve Shahmahmoodi, S. (2020) CDK1 and PLK1 are key regulator proteins in human Papilloma virus Type 16- Positive Cervical Cancer: A Network-Based Study. *Medical Science.*, 24(101), 201-214.
- [6] Turanlı, B., Altay, O., Borén, J., Turkez, H., Nielsen, J., Uhlen, M., Arga, K.Y., ve Mardinoglu A. (2019) Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology.*, 68, 47-58.
- [7] Banno, K., Iida, M., Yanokura, M., Irie, H., Masuda, K., Kobayashi, Y., Tominaga, E. ve Aoki D. (2015) Drug repositioning for gynecologic tumors: a new therapeutic strategy for cancer. *TheScientificWorldJournal.*, 2015, 1-10.
- [8] Sharma, S., Baksi, R. ve Agarwal, M. (2016) Repositioning of anti-viral drugs as therapy for cervical cancer. *Pharmacological Reports.*, 68(5), 983-989.
- [9] Clough, E. ve Barrett, T. (2016) The Gene Expression Omnibus database. *Methods in Molecular Biology.*, 1418(301), 93-110.
- [10] Parkinson, H., Kapushesky, M., Shojatalab, M., Abeygunawardena, N., Coulson, R., Farne, A., Holloway, E., Kolesnykov, N., Lilja, P., Lukk, M., Mani, R., Rayner, T., Sharma, A., William, E., Sarkans, U. ve Brazma A. (2007) ArrayExpress - A public database of microarray experiments and gene expression profiles. *Nucleic Acids Research.*, 35(Database issue), D747-D750
- [11] Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. ve Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England).*, 4(2), 249-264.
- [12] Smyth, G.K., Ritchie, M. ve Thorne, N. (2010) Linear Models for Microarray Data User's Guide.
- [13] Pagès, H., Carlson, M., Falcon, S. ve Li, N. (2017) AnnotationDbi: Annotation Database Interface. R package version 1.36.2, *Bioconductor Package Maintainer.*
- [14] Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C. ve Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications.*, 10(1), 1523.
- [15] Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. ve Lempicki R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology.* 4 (9), R60.
- [16] Stark, C., Breitkreutz, B.J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A. ve Tyers, M. (2006) BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic acids research.*, 34 (Database issue), 535-539.
- [17] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O. ve Baliga, N.S. (1971) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Research.*, 13(22), 426.
- [18] Chin, C.H., Chen, S.H., Wu, H.H., Ho, C.W., Ko, M.T. ve Lin, C.Y. (2014) cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology.*, 8(4), S11.
- [19] Gungor, M.A. ve Karagoz, I. (2015) The homogeneity map method for speckle reduction in diagnostic ultrasound images. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation.*, 68, 100-110.

- [20] Turanli, B., Gulfidan, G. ve Arga, K.Y. (2017) Transcriptomic-Guided Drug Repositioning Supported by a New Bioinformatics Search Tool: geneXpharma. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.*, 21(10), 584–591.
- [21] Wagner, A.H., Coffman, A.C., Ainscough, B.J., Spies, N.C., Skidmore, Z.L., Campbell, K.M., Krysiak, K., Pan, D., McMichael, J. F., Eldred, J. M., Walker, J. R., Wilson, R. K., Mardis, E. R., Griffith, M. ve Griffith, O. L. (2016) DGIdb 2.0: Mining clinically relevant drug-gene interactions. *Nucleic Acids Research.*, 44 (Database Issue), D1036–D1044.
- [22] Amelio, I., Gostev, M., Knight, R.A., Willis, A.E., Melino, G. ve Antonov, A. V. (2014) DRUGSURV: A resource for repositioning of approved and experimental drugs in oncology based on patient survival information. *Cell Death and Disease.*, 5(2), e1051.
- [23] Islam, T., Rahman, R., Gov, E., Turanli, B., Gulfidan, G., Haque, A., Arga, K. Y. ve Mollah, N. H. (2018) Drug Targeting and Biomarkers in Head and Neck Cancers: Insights from Systems Biology Analyses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.*, 22(6), 422–436.
- [24] Gov, E., Kori, M. ve Arga, K.Y. (2017) Multiomics Analysis of Tumor Microenvironment Reveals Gata2 and miRNA-124-3p as Potential Novel Biomarkers in Ovarian Cancer. *OMICS A Journal of Integrative Biology.*, 21(10), 603–615.
- [25] Rahman, M.R., Petralia, M.C., Ciurleo, R., Bramanti, A., Fagone, P., Shahjaman, M., Wu, L., Sun, Y., Turanli, B., Arga, K. Y., Islam, M. R., Islam, T. ve Nicoletti, F. (2020) Comprehensive analysis of rna-seq gene expression profiling of brain transcriptomes reveals novel genes, regulators, and pathways in autism spectrum disorder. *Brain Sciences.*, 10(10), 747.
- [26] Calimlioglu, B., Karagoz, K., Sevimoglu, T., Kilic, E., Gov, E. ve Arga, K.Y. (2015) Tissue-Specific Molecular Biomarker Signatures of Type 2 Diabetes: An Integrative Analysis of Transcriptomics and Protein-Protein Interaction Data. *Omics : a journal of integrative biology.*, 19(9), 563–573.
- [27] Karagoz, K., Lehman, H.L., Stairs, D.B., Sinha, R. ve Arga, K.Y. (2016) Proteomic and Metabolic Signatures of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Current cancer drug targets.*, 16(8), 721-736.
- [28] Turanli, B., Karagoz, K., Bidkhorji, G., Sinha, R., Gatzka, M.L., Uhlen, M., Mardinoglu A. ve Arga, K.Y. (2019) Multi-omic data interpretation to repurpose subtype specific drug candidates for breast cancer. *Frontiers in Genetics.*, 10, 420.
- [29] Wang, S. ve Chen, X. (2018) Identification of potential biomarkers in cervical cancer with combined public mRNA and miRNA expression microarray data analysis. *Oncology Letters.*, 47(9), 755–765.
- [30] Gulfidan, G., Turanli, B., Beklen, H., Sinha, R. ve Arga, K.Y. (2020) Pan-cancer mapping of differential protein-protein interactions. *Scientific Reports.*, 10(1), 1–12.
- [31] Kirn, V., Zaharieva, I., Heublein, S., Thangarajah, F., Friese, K., Mayr, D. ve Jeschke, U. (2014) ESR1 promoter methylation in squamous cell cervical cancer. *Anticancer Research.*, 34(2), 723–727.
- [32] Matsuda, Y., Ueda, J. ve Ishiwata, T. (2012) Fibroblast growth factor receptor 2: Expression, roles, and potential as a novel molecular target for colorectal cancer. *Pathology Research International.*, 2012 574768.
- [33] Branca, M., Ciotti, M., Giorgi, C., Santini, D., Di Bonito, L., Costa, S., Benedetto, A., Bonifacio, D., Bonito P.D., Paba, P., Accardi, L., [Syrjänen](#), S., Favalli, C., [Syrjänen](#), K. ve HPV-PathogenISS Study Group . (2007) Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.*, 130(2), 223–31.
- [34] Rhiem, K., Fischer, C., Bosse, K., Wappenschmidt, B. ve Schmutzler R.K. (2007) Increased risk of cervical cancer in high-risk families with and without mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Journal of Clinical Oncology.*, 25(18), 1512.
- [35] Logé, C., Testard, A., Thiéry, V., Lozach, O., Blairvacq, M., Robert, J.M., Meijer L. ve Besson, T. (2008) Novel 9-oxo-thiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbonitrile derivatives as dual cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)/glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 43(7), 1469–1477.
- [36] Zhai, Y., Kuick, R., Nan, B., Ota, I., Weiss, S.J., Trimble, C.L., Fearon, E.R. ve Cho, K.R. (2007) Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Research.*, 67(21), 10163-72.
- [37] Scotto, L., Narayan, G., Nandula, S. V., Arias-Pulido, H., Subramaniyam, S., Schneider, A., Kaufmann, A.M., Wright, J.D., Pothuri, B., Mansukhani, M. ve Murty, V.V. (2008) Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: Potential role in progression. *Genes Chromosomes and Cancer.*, 47(9), 755–65.
- [38] Espinosa, A.M., Alfaro, A., Roman-Basaure, E., Guardado-Estrada, M., Palma, Í., Serralde, C., Medina I., [Juárez](#), E., [Bermúdez](#), M., [Márquez](#), E.,

- [Borges-Ibáñez](#), M., [Muñoz-Cortez](#), S., [Alcántara-Vázquez](#), A., Alonso, P., Curiel-Valdez, [José](#)., Kofman, S., Villegas, N. ve Berumen, J. (2013) Mitosis Is a Source of Potential Markers for Screening and Survival and Therapeutic Targets in Cervical Cancer. *PLoS ONE*., 8(2), e55975.
- [39] Medina-Martinez, I., Barrón, V., Roman-Bassaure, E., Juárez-Torres, E., Guardado-Estrada, M., Espinosa, A.M., Bermudez, M., [Fernández](#), F., Venegas-Vega, C., Orozco, L., Zenteno, E., Kofman, S. ve Berumen, J. (2014) Impact of gene dosage on gene expression, biological processes and survival in cervical cancer: A genome-wide follow-up study. *PLoS ONE*., 9(5), e97842.
- [40] Boon, J. a., Pyeon, D., Wang, S.S., Horswill, M., Schiffman, M., Sherman, M., Zuna, R.E., Whang, Z., Hewitt, S.M., Pearson, R., Schott, M., Chung, L., He, Q., Lambert, P., Walker, J., Newton, M.A., Wentzensen, N. ve Ahlquist, P. (2015) Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*., 1125(25), E3255-64.
- [41] Srivastava, P., Mangal, M. ve Agarwal, S.M. (2014) Understanding the transcriptional regulation of cervix cancer using microarray gene expression data and promoter sequence analysis of a curated gene set. *Gene*., 535(2), 233–238.
- [42] Sharma, G. ve Agarwal, S. (2014) Identification of Critical MicroRNA Gene Targets in Cervical Cancer Using Network Properties. *MicroRNA*., 3(1), 37–44.
- [43] Wei, L.H. ve Kuo, M.L. ve Chen, C.A. ve Chou, C.H. ve Lai, K.B. ve Lee, C.N. ve Hsieh, C.Y. (2003) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*., 22, 1517-1527.
- [44] Gao, C., Zhou, C., Zhuang, J., Liu, L., Liu, C., Li, H., Liu, G., Wei, J. ve Sun, C. (2018) MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Journal of Cellular Biochemistry*., 119(8), 7080–7090.
- [45] Cai, N., Hu, L., Xie, Y., Gao, J.H., Zhai, W., Wang, L., Jin, Q.J., Qin, J.Y. ve Qiang, R. (2018) MiR-17-5p promotes cervical cancer cell proliferation and metastasis by targeting transforming growth factor- β receptor 2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*., 22(7), 1899–1906.
- [46] Wang, C.Z., Deng, F., Li, H., Wang, D.D., Zhang, W., Ding, L. ve Tang, J.H. (2018) MiR-101: A potential therapeutic target of cancers. *American Journal of Translational Research*., 10(11), 3310–3321.
- [47] Lee, B.K., Bhinge, A.A. ve Iyer, V.R. (2011) Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Research*., 39(9), 3558–73.
- [48] Paquin, M.C., Leblanc, C., Lemieux, E., Bian, B. ve Rivard, N. (2013) Functional impact of colorectal cancer-associated mutations in the transcription factor E2F4. *International Journal of Oncology*., 43(6), 2015–22.
- [49] Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y. ve Leone, G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews Cancer*., 9(11), 785–797.
- [50] Verschoor, M.L., Wilson, L.A., Verschoor, C.P. ve Singh, G. (2010) Ets-1 regulates energy metabolism in cancer cells. *PLoS ONE*., 5(10), e13565.
- [51] Huang, M., Chen, Q., Xiao, J., Yao, T., Bian, L., Liu, C. ve Lin, Z. (2014) Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α is a predictor of poor prognosis in cervical cancer: A clinicopathologic study and a meta-analysis. *International Journal of Gynecological Cancer*., 24(6), 1054–64.
- [52] Turanli, B., Zhang, C., Kim, W., Benfeitas, R., Uhlen, M., Arga, K.Y. ve Mardinoglu A. (2019) Discovery of therapeutic agents for prostate cancer using genome-scale metabolic modeling and drug repositioning. *EBioMedicine*., 42, 386-396.
- [53] Sakonlaya, D., Tapanadechopone, P., Poomkokruk, A. ve Charoenvilaisiri, S. (2012) Do NSAIDs inhibit growth of precancerous cervical cells in vitro? *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*., 95, 65–73.